

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/KR2006/000915

International filing date: 14 March 2006 (14.03.2006)

Document type: Certified copy of priority document

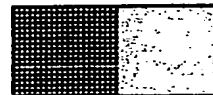
Document details: Country/Office: KR
Number: 10-2005-0020863
Filing date: 14 March 2005 (14.03.2005)

Date of receipt at the International Bureau: 30 June 2006 (30.06.2006)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse



별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto is a true copy from the records of the Korean Intellectual Property Office.

출원번호 : 10-2005-0020863

Application Number

출원년월일 : 2005년 03월 14일

Date of Application : MAR 14, 2005

출원인 : 학교법인 성균관대학

Applicant(s) : SUNGKYUNKWAN UNIVERSITY

2006년 05월 16일



특허청

COMMISSIONER



◆ This certificate was issued by Korean Intellectual Property Office. Please confirm any forgery or alteration of the contents by an issue number or a barcode of the document below through the KIPOnet- Online Issue of the Certificates' menu of Korean Intellectual Property Office homepage (www.kipo.go.kr). But please notice that the confirmation by the issue number is available only for 90 days.

【서지사항】

| | |
|------------|---------------------------------------------|
| 【서류명】 | 특허출원서 |
| 【권리구분】 | 특허 |
| 【수신처】 | 특허청장 |
| 【제출일자】 | 2005.03.14 |
| 【발명의 국문명칭】 | 사람파필로마바이러스 진단방법 |
| 【발명의 영문명칭】 | Method for diagnosing human papilloma virus |
| 【출원인】 | |
| 【명칭】 | 학교법인 성균관대학 |
| 【출원인코드】 | 2-2000-046202-2 |
| 【대리인】 | |
| 【성명】 | 손민 |
| 【대리인코드】 | 9-1999-000420-6 |
| 【포괄위임등록번호】 | 2004-060842-2 |
| 【발명자】 | |
| 【성명】 | 양주성 |
| 【성명의 영문표기】 | Yang Joo-Sung |
| 【주민등록번호】 | 630530-1009518 |
| 【우편번호】 | 137-937 |
| 【주소】 | 서울시 서초구 방배4동 현대1차Apt. 103-1503 |
| 【국적】 | KR |
| 【발명자】 | |
| 【성명】 | 차혜란 |
| 【성명의 영문표기】 | Cha Hyeran |
| 【주민등록번호】 | 800118-2155218 |
| 【우편번호】 | 150-045 |
| 【주소】 | 서울시 영등포구 당산동5가 효성Apt. 101동 1202호 |
| 【국적】 | KR |

【핵산염기 및 아미노산 서열목록】**【서열개수】** 16**【서열목록의 전자문서】** 첨부**【취지】** 특허법 제42조의 규정에 의하여 위와 같이 출원합니다.

대리인

손민 (인)

【수수료】

| | | |
|------------------|----------|----------|
| 【기본출원료】 | 0 면 | 38,000 원 |
| 【가산출원료】 | 32 면 | 0 원 |
| 【우선권주장료】 | 0 건 | 0 원 |
| 【심사청구료】 | 0 항 | 0 원 |
| 【합계】 | 38,000 원 | |
| 【감면사유】 | 학교 | |
| 【감면후 수수료】 | 19,000 원 | |

【요약서】**【요약】**

본 발명은 HPV L1 유전자형 11, 16, 18 및 31의 특이한 PCR 증폭 프라이머 염기 서열, 이를 이용하여 HPV L1 유전자를 정량적으로 검출할 수 있는 PCR 증폭 방법 및 인체 조직 내에 HPV 유형의 DNA 존재를 분석하는 방법에 관한 것이다.

【대표도】

도 1

【색인어】

사람 파필로마 바이러스 (Human Papilloma Virus; HPV), 자궁경부암 (Cervical Cancer), 프라이머 (Primer), 중합효소 연쇄반응 (Polymerase Chain Reaction)

【명세서】

【발명의 명칭】

사람파필로마바이러스 진단방법(Method for diagnosing human papilloma virus)

【도면의 간단한 설명】

- <1> 도 1은 HPV 유전형 11, 16, 18, 31 L1 유전자를 증폭하여 제조한 재조합 플라스미드의 클로닝 확인 결과이다.
- <2> 도 2는 HPV 16 L1 서열의 배열을 나타낸 것이다.
- <3> 도 3은 HPV 31 L1 서열의 배열을 나타낸 것이다.
- <4> 도 4는 HPV 11 L1 서열의 배열을 나타낸 것이다.
- <5> 도 5는 HPV 18 L1 서열의 배열을 나타낸 것이다.
- <6> 도 6은 HPV 유전자형에 따른 염기서열 비교 결과이다.
- <7> 도 7은 HPV 11, 16, 18, 31 L1 주형에 따른 민감성 실험 결과이다.
- <8> 도 8은 HPV 11, 16, 18, 31 L1 주형에 따른 차별성 실험 결과이다.
- <9> 도 9는 일정량의 HPV L1 플라스미드에 다양한 DNA 배경을 첨가한 응용성 실험 결과이다.

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

- <10> 본 발명은 인유두종 바이러스의 유전자를 진단하기 위한 증폭 정량 방법 및 유전자 표준품에 관한 것이다.
- <11> 자궁경부암의 대부분은 인유두종 바이러스(Human Papilloma virus; 이하 HPV)에 의해서 발생하게 된다. 이것은 한국 여성 암의 22.1%에 달하며, 사망률 2위를 차지하고 있어, 자궁경부암의 예방, 진단 및 치료가 중요한 문제로 여겨지고 있다.
- <12> HPV는 8kb의 환상 이중나선 바이러스로서, 모든 유형의 HPV는 유사한 성질의 단백질을 합성하는 DNA 부분인 열린 해독틀(open reading frames; ORFs)을 가지며, 크게 초기 유전자(early gene)와 후기 유전자(late gene)로 구분된다. 약 4.5kb의 초기 유전자는 바이러스 DNA 복제(E1), 숙주 세포의 악성화 변형(malignant transformation)을 야기하는 단백질을 형성하는 DNA의 작용을 유발하거나 억제(E2), 숙주세포와 바이러스 성장과 관련된 단백질의 합성(E4), EGF(epidermal growth factor)와 CSF(colony stimulator factor) 수용체의 작동유발(E5), 세포의 영구생존 및 암 유전자의 활성화와 암 억제인자의 비활성화 기전에 의한 악성화 변형(E7) 등으로 나눌 수 있다. 특히 HPV가 숙주의 상피세포를 감염시킨 후에 발현되는 종양원성(oncogenic) 단백질인 E6과 E7은 각각 숙주세포의 종양 억제 단백질인 p53과 pRB와 결합하여 이들 종양 억제 단백질의 기능을 억제함으로서, 결과적으로

감염 세포의 형질전환에 따른 종양형성으로 발전하는 것으로 규명되고 있다. 반면에 2.5kb의 후기 유전자는 바이러스 주외피 단백질(L1)과 부외피 단백질(L2)의 합성을 담당하는 DNA와 이들의 전사와 번역 기능을 조절하는 비발현 부분(non-coding region)인 1kb 크기의 LCR(long control region)으로 이루어져 있다.

<13> 최근 분자생물학적 기법의 급속한 발전에 따라 HPV의 유전학적 구조가 밝혀지면서 많은 유형(genotype)의 HPV 게놈 염기서열이 밝혀지고 있다. HPV는 E6, E7, L1 유전자의 ORF 서열의 차이에 따라 유형이 결정되는데, 상기 ORF의 뉴클레오타이드 서열이 10% 이상 다르면 새로운 유형으로 정의되고, 2% 이상 10% 미만이면 아형(subtype), 2% 미만이면 다른 경우에는 변이체(variant)로 정의된다. 이와 같은 구분에 따라 현재까지 HPV는 120여종 이상의 유형이 알려져 있다. 그 중에서 HPV -16, -18, -31 외 약 20개의 유형이 자궁경부암으로의 진행률이 상대적으로 높은 것으로 밝혀져 있어 '고위험군(high-risk group)' HPV로 분류되며, HPV -11 외 약 14개의 유형은 자궁경부암으로의 진행률이 낮아 '저위험군(low-risk group)' HPV로 알려져 있으므로, HPV 감염의 생물학적 특징의 다양성이 자궁경부암의 진단과 예방에 중요한 의미를 지닌다는 것을 암시하고 있다.

<14> 자궁경부암의 가장 간단한 조기진단법은 병리세포학적 검사인 자궁경부 세포진검사로서 자궁표면의 노화된 세포를 채집, 염색하여 상피세포 핵주위에 공동화(perinuclear halo)를 보이는 공동세포증(koilocytosis) 등의 특징적인 병리소견으로 진단하는 방법인데, 그 진단율이 1 내지 15%로 낮고, 진단 상 많은 제한이 있어, 이를 보완하기 위하여 질확대경진을 시행하여 HPV 감염을 70%까지 진단할 수

있으나, 장비가 고가이며, 고도로 숙련된 판독자가 필요하고, 악성화위험도가 다른 HPV 유전형을 분류할 수 없다는 단점이 있었다. 이에 따라 자궁경부암 전구 병변의 진단을 위한 선별검사 또는 자궁경부 세포진 검사의 보조적 수단으로서 HPV의 존재와 유전형을 확인하는 기법들에 관한 연구가 지속적으로 진행되고 있는 실정이다.

<15> 상기 HPV의 존재 및 유전형 확인 방법은 크게 HPV DNA 직접 확인법과 HPV DNA의 증폭을 이용하는 방법으로 나눌 수 있다. 상기 HPV DNA의 직접 확인법으로는 서던 블롯팅(southern blotting), 도트 블롯팅(dot blotting) 및 FISH(Filter in situ hybridization)등이 있고, HPV DNA의 증폭을 이용하는 방법으로는 타입-특이적(type-specific) 중합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction; 이하 PCR), 공통-프라이머(general-primer) PCR 등이 있다.

<16> 감염성 질병을 진단하는데 사용되는 핵산관련 실험은 개체와 임상적 물질로부터 핵산을 분리하는 표준방법을 사용한다. 표적 DNA(target DNA) 혹은 RNA는 임상 표본에 적게 존재하기 때문에 여러 가지 신호 증폭(signal amplification)과 표적 증폭(target amplification) 기술은 진단 실험실에서 주요하게 사용된다. 이러한 방법은 검출(detection)을 돕고, 배양되지 않은 개체의 확인(identification)에 유용하고, 진단과 또 감염성병의 치료에도 도움을 준다. 핵산 증폭 기술(Nucleic acid amplification technique; NAT)은 검출할 수 있는 수준에서 낮은 농도로 원하는 표적이 존재할 때 그것을 선택적으로 증폭시킬 수 있는 가능성을 제시하므로 널리 이용되고 있다. NAT는 바이러스의 정성적인 검출뿐만 아니라, 정량적인 면에서

임상 시료(clinical sample)내의 바이랄 로드(viral load)의 진단법과 예측, 그리고 치료적인 모니터링(monitors)을 위해 그 중요성이 인식되고 있다(Pfaller M.A *Emer. Infect. Dis.* 7, 2, 2001).

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

- <17> 본 발명의 목적은 서열번호 1과 2의 프라이머 쌍, 서열번호 3과 4의 프라이머 쌍, 서열번호 5와 6의 프라이머 쌍 및 서열번호 7과 8의 프라이머 쌍 중에서 선택된 프라이머 쌍을 제공하는 것이다.
- <18> 본 발명의 또 다른 목적은 서열번호 1과 2의 프라이머 쌍, 서열번호 3과 4의 프라이머 쌍, 서열번호 5와 6의 프라이머 쌍 및 서열번호 7과 8의 프라이머 쌍 중에서 선택된 하나 이상의 프라이머 쌍을 사용하여 생물학적 시료의 DNA에 대해 증폭소 연쇄반응을 수행하여 HPV의 DNA를 증폭하는 방법을 제공하는 것이다.
- <19> 본 발명의 또 다른 목적은 서열번호 1과 2의 프라이머 쌍을 사용하여 HPV11-L1 DNA를 증폭하는 방법을 제공하는 것이다.
- <20> 본 발명의 또 다른 목적은 서열번호 3과 4의 프라이머 쌍을 사용하여 HPV16-L1 DNA를 증폭하는 방법을 제공하는 것이다.
- <21> 본 발명의 또 다른 목적은 서열번호 5와 6의 프라이머 쌍을 사용하여 HPV18-L1 DNA를 증폭하는 방법을 제공하는 것이다.
- <22> 본 발명의 또 다른 목적은 서열번호 7과 8의 프라이머 쌍을 사용하여 HPV31-

L1 DNA를 증폭하는 방법을 제공하는 것이다.

- <23> 본 발명의 또 다른 목적은 서열번호 1과 2의 프라이머 쌍, 서열번호 3과 4의 프라이머 쌍, 서열번호 5와 6의 프라이머 쌍 및 서열번호 7과 8의 프라이머 쌍 중 선택된 하나 이상의 프라이머 쌍을 포함하는 HPV의 DNA 검출용 키트를 제공하는 것이다.

【발명의 구성】

- <24> 하나의 양태로서 본 발명은 서열번호 1과 2의 프라이머 쌍, 서열번호 3과 4의 프라이머 쌍, 서열번호 5와 6의 프라이머 쌍 및 서열번호 7과 8의 프라이머 쌍 중에서 선택된 프라이머 쌍을 제공하는 것이다.

- <25> 본 발명의 "프라이머"는 짧은 자유 3 말단 수산화기(free 3' hydroxyl group)를 가지는 핵산 서열로 상보적인 템플레이트(template)와 염기쌍(base pair)을 형성할 수 있고 템플레이트 가닥 복사를 위한 시작 지점으로 기능을 하는 짧은 핵산 서열을 의미한다. 프라이머는 적절한 완충용액 및 온도에서 중합반응(즉, DNA 폴리머레이즈 또는 역전사효소)을 위한 시약 및 상이한 4가지 뉴클레오사이드 트리포스페이트의 존재 하에서 DNA 합성을 개시할 수 있다. 본 발명의 프라이머는, 각 HPV L1에 특이적인 프라이머로 15 내지 50개의 뉴클레오타이드 서열을 가진 센스 및 안티센스 핵산이다. 프라이머는 DNA 합성의 개시점으로 작용하는 프라이머의 기본 성질을 변화시키지 않는 추가의 특징을 혼입할 수 있다.

<26> 본 발명의 프라이머는 포스포르아미다이트 고체 지지체 방법, 또는 기타 널리 공지된 방법을 사용하여 화학적으로 합성할 수 있다. 이러한 핵산 서열은 또한 당해 분야에 공지된 많은 수단을 이용하여 변형시킬 수 있다. 이러한 변형의 비제한적인 예로는 메틸화, 캡화, 천연 뉴클레오타이드 하나 이상의 동족체로의 치환, 및 뉴클레오타이드 간의 변형, 예를 들면, 하전되지 않은 연결체(예: 메틸 포스포네이트, 포스포트리에스테르, 포스포로아미데이트, 카바메이트 등) 또는 하전된 연결체(예: 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트 등)로의 변형이 있다. 핵산은 하나 이상의 부가적인 공유 결합된 잔기, 예를 들면, 단백질(예: 뉴클레아제, 독소, 항체, 시그날 펩타이드, 폴리-L-리신 등), 삽입제(예: 아크리딘, 프로칼렌 등), 킬레이트화제(예: 금속, 방사성 금속, 철, 산화성 금속 등), 및 알킬화제를 함유할 수 있다. 본 발명의 핵산 서열은 또한 검출 가능한 시그날을 직접적으로 또는 간접적으로 제공할 수 있는 표지를 이용하여 변형시킬 수 있다. 표지의 예로는 방사성 동위원소, 형광성 분자, 바이오틴 등이 있다.

<27> 또 다른 양태로서 본 발명은 서열번호 1과 2의 프라이머 쌍, 서열번호 3과 4의 프라이머 쌍, 서열번호 5와 6의 프라이머 쌍 및 서열번호 7과 8의 프라이머 쌍 중에서 선택된 하나 이상의 프라이머 쌍을 사용하여 생물학적 시료의 DNA에 대해 중합효소 연쇄반응을 수행하여 HPV의 DNA를 증폭하는 방법을 제공하는 것이다.

<28> 본 발명에서 용어 "생물학적 시료"란 인유두종 바이러스에 의해 인유두종 바이러스 주외피 단백질의 유전자 발현 수준이 차이나는 조직, 세포, 전혈, 혈청, 혈장, 타액, 객담, 뇌척수액 또는 뇨와 같은 시료들을 포함하나, 이에 제한되지 않는

다.

<29>

본 발명의 "PCR(polymerase chain reaction)법"은 유전자 진단 방법중 하나로 특정 DNA 영역을 시험관 내에서 효소에 의해 증폭하는 방법이다. 1985년 폴리스(Mullis) 등에 의해 개발되었고, 그는 1993년 노벨 화학상을 받았다.

PCR(polymer chain reaction)은 DNA의 원하는 부분을 증폭하는 방법이다. DNA 분자의 어느 부분이든지 그 보더 서열(border sequence)만 알면 이 방법을 통해서 증폭할 수 있다. PCR은 기본적으로 변성, 결합, 신장의 세 단계로 구성되어 있고, 이 과정이 반복되면서 DNA가 증폭된다. 기본적으로 PCR을 구성하고 있는 요소들에는

DNA 주형(template), 프라이머(primer), dNTP, 폴리머라제(polymerase)등이 있으며, PCR 과정에서 그것의 민감도와 정확성에 가장 영향을 미치는 것은 프라이머와 온도이다. PCR의 원리는 3가지 단계를 반복하여 특정 DNA 영역을 증폭한다. 제 1단계는 게놈 DNA를 단일쇄로 변성시킨다. 제 2단계는 목적하는 영역을 사이에 두는 두 종류의 20염기 정도의 합성 올리고뉴클레오티드를 단일쇄 DNA에 결합(annealing) 시킨다. 제 3단계는 올리고뉴클레오티드를 시발체(Primer)로 고열에 내성인 DNA 폴리머라제에 의해 DNA를 합성하고 이상의 사이클을 25~30회 반복한다. 이 반응에 의해 이론적으로 약 100만배(n 사이클 후에 2^n 배) 증폭되지만, 실제로 사이클을 진행하면 반응이 고원기에 달하여 수십만배 정도가 증폭된다. 원래 방법에서는 DNA 합성에서 대장균 DNA 폴리머라제인 클렌나우 단편(Klenow fragment)가 사용되었지만, 그 후 내열성 Taq DNA 폴리머라제가 이용되어 자동화가 간편하게 되었다.

<30> PCR법을 유전자 진단에 응용하는 변이 유전자의 분석에서는, 특정 영역에 변이 존재여부를 알고자 함이며 몇 가지 방법이 있다. 첫째, RNase 또는 화학적 절단에 의한 변이 검출법이다. 표지된 정상 배열 RNA 소식자를 PCR 증폭한 DNA에 보합결합하면, 변이 부위에 미스 매치(miss match)가 일어나고, 이곳이 RNase A에 의해 절단이 일어난다. 이것을 겔 전기영동하여 염기 치환의 존재와 대강의 위치를 아는 방법이다. RNase A는 피리미딘의 3' 측만을 절단하며 모든 염기 치환을 알아낼 수 있지는 않다. 따라서 미스 매치(miss match) 염기 C나 T를 화학적으로 절단하는 방법이 개발되고 있는데, 센스 쇠 또는 안티센스 쇠를 사용하여 점돌연변이의 확인이 가능하다.

<31> 둘째, 단일쇄 DNA 고차 구조 변화 검출법(PCR-SSCP)이다. DNA 단편을 변성시켜 단일쇄를 요소를 포함하지 않는 폴리아크릴아마이드 겔에서 전기영동하면, 각 DNA쇄의 염기배열에 다른 고차 구조의 단일쇄를 분리할 수 있다. 하나라도 염기 치환이 있으면 이 구조가 변화하고, 정상적인 배열을 가지는 DNA쇄와 구별할 수 있기 때문에 단일쇄 DNA 고차 구조 다형성(SSCP:Single Strand Conformation Polymorphism)이라고 불린다. 이 방법은 이동도의 차이로 변이를 결정하기 때문에, 정상 배열이 혼재하는 이형접합체나, 암 조직 등에서 감도가 높게 변이를 검출할 수 있다.

<32> 셋째, 변성 농도 구배 겔 전기영동(DGGE)이다. DNA 소식자를 표적 영역으로 보합결합한 후, 요소와 포름아미드의 농도 구배를 겔에서 전기영동 하는 것으로 (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, DDGE), 만일 미스 매치(miss matc

h)가 있으면 저농도에서 이 영역이 변성되고, 기포상으로 영동거리가 단축하기 때문에 1염기 치환의 존재를 확인할 수 있다. 그러나 DNA 분자의 부분적인 변성이 필요하기 때문에 검출능이 단편(fragment) GC함량에 의존하여 50% 정도의 검출 효율을 가진다. PCR법으로 40 염기의 GC rich 배열을 목적 단편에 첨가한 PCR 산물(GC clamp)을 직접 DGGE에 걸면 단편의 GC함량에 관계없이 감도가 높게 점돌연변이를 검출할 수 있다. 이상과 같이 변성제에 의해 농도 구배를 만드는 대신 두 종류의 열블락(heat block)으로 온도 구배를 만들어 같은 효과를 기대하는 방법(열구배 전기영동법)도 보고되어 있다. 이상과 같은 방법으로 변이가 존재하는 영역을 대략적으로 알게되면, 다음에는 그 변이의 성상을 염기 수준에서 명백히 한다.

<33> 이 외에도 RT-PCR(Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction), RACE(Rapid Amplification of cDNA Ends), ISPCR(In Situ Polymerase Chain Reaction), DDRT-PCR(Differential Display Reverse Transcriptase PCR) 등의 다양한 종류가 있다.

<34> 또 다른 양태로서 본 발명은 서열번호 1과 2의 프라이머 쌍을 사용하여 HPV11-L1 DNA를 증폭하는 방법을 제공하는 것이다.

<35> 또 다른 양태로서 본 발명은 서열번호 3과 4의 프라이머 쌍을 사용하여 HPV16-L1 DNA를 증폭하는 방법을 제공하는 것이다.

<36> 또 다른 양태로서 본 발명은 서열번호 5와 6의 프라이머 쌍을 사용하여 HPV18-L1 DNA를 증폭하는 방법을 제공하는 것이다.

<37> 또 다른 양태로서 본 발명은 서열번호 7과 8의 프라이머 쌍을 사용하여

HPV31-L1 DNA를 증폭하는 방법을 제공하는 것이다.

<38> 또 다른 양태로서 본 발명은 서열번호 1과 2의 프라이머 쌍, 서열번호 3과 4의 프라이머 쌍, 서열번호 5와 6의 프라이머 쌍 및 서열번호 7과 8의 프라이머 쌍 중 선택된 하나 이상의 프라이머 쌍을 포함하는 HPV의 DNA 검출용 키트를 제공하는 것이다.

<39> 본 발명의 "키트"는 본 발명의 핵산을 증폭 또는 검출하기 위한 키트를 제공한다. 일례에서, 키트는 패키지 형태(packaged form)이고 스트랜드 치환 반응과 관련하여 DNA 폴리머라제 및 엔도뉴클레아제의 사용과 관련된 안내서를 포함한다.

<40> 본 발명에 따른 PCR 반응은 통상적인 공지된 PCR 방법에 의해 수행될 수 있으며, 바람직하게는 94℃에서 1분간 변성, 51℃에서 1분간 결합 및 72℃에서 1분 또는 1분 30초간 연장시키는 반응을 35회 수행함으로써 수행될 수 있으나, 이러한 PCR 조건으로 제한하고자 하는 것은 아니다.

<41> 본 발명에 따른 PCR 반응의 특징은 기존의 인유두종 바이러스 (Human Papilloma Virus) 핵산 증폭방법을 개량하여 정량화된 핵산 증폭방법을 수립한 핵산증폭 방법의 표준품으로서 하기 수학식 1의 방법으로 계산한 플라스미드 수를 이용하여 정량화된 PCR을 수행할 수 있다.

<42> 이하 본 발명을 하기 실시예에 의하여 보다 상세히 설명한다. 단 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것으로 본 발명의 내용이 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

<43> <실시예 1> 재조합 HPV L1 플라스미드(표준품) 제조

<44> 유전자은행(Genbank)에 등록되어 있는 서로 다른 HPV 주외피 단백질(HPV L1) 서열을 통해 유형-특이성 PCR 프라이머 (type-specific PCR primer)를 고안하였다. 본 발명에서 선택한 유전형은 저위험군 11 및 고위험군 16, 18, 31이다. 한국인에 게서 많이 발견되는 HPV 유전형을 수득하기 위해, 한국인 자궁경부암 환자의 조직을 임상 병원으로부터 확보하고 이로부터 HPV 유전자원인 게놈 DNA를 추출한다. 생체조직 시료는 병리 검사를 위하여 마련된 파라핀 섹션(paraffin section) 혹은 생체검사 시료(biopsy sample)일 수 있다. 이를 주형(template)으로 하고 표 1에 나와 있는 서열번호 9 내지 16으로 제작된 프라이머를 이용하여 약 1.6kb 가량의 PCR 산물(product)을 수득하였다.

【표 1】

<45>

| 유전자형 | PCR 단편 길이 | PCR 프라이머 서열 | |
|-------|-----------|-------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|
| | | sense | anti-sense |
| HPV16 | 1596bp | 5'GCCCCC <u>AAGCTT</u> GCCGCCACCATGCAGGTGACTTTTATTACATCC 3' (서열번호 9) | 5'ATCGGGCTCGAGCAGCTTACGTTTTTTCGTTTACG 3' (서열번호 10) |
| | | 5'GCCCCC <u>AAGCTT</u> GCCGCCACCATGTGCTGTATACACGG 3' (서열번호 11) | 5'ATCGGGGAATTCCTTCTCGCACTACAGCACACG 3' (서열번호 12) |
| HPV31 | 1515bp | 5'GCCCCC <u>AAGCTT</u> GCCGCCACCATGTCTCTGTGGGGCCTAGC 3' (서열번호 13) | 5'ATCGGGGAATTCCTTTTACGTTTTTTTACGTTTCTGCTGGTGTAGTGG 3' (서열번호 14) |
| | | 5'GCCCCC <u>AAGCTT</u> GCCGCCACCATGTGGGGCCTAGCGACAGC 3' (서열번호 15) | 5'ATCGGGGAATTCCTTTTGGTTTGGTACGTTTTCGTTTGGG 3' (서열번호 16) |

<46> PCR의 조건은 다음과 같다. 환자의 조직에서 확보한 DNA를 주형으로 하고, 2.5mM dNTP, 반응 버퍼(reaction buffer), 표 1의 프라이머 쌍(20 pmol)을 넣고 슈퍼 탁 플러스(super Taq Plus)를 사용하여 PCR을 수행하였다. 프라이머의 최적 결합 온도(optimum annealing temperature)에 따라서 변성(denaturation: 94℃, 1분), 결합(annealing: annealing temp. Ta, 1분), 연장(extension: 72℃, 1분 30초) 사이클을 35회 반복 후, 마지막으로 72℃에서 10분 동안 연장하였다. PCR 산물을 제한효소로 처리한 후에 pGEM-T-easy 벡터에 넣어서 클로닝한 후에, 제한효소 EcoRI 으로 처리하여 삽입물(insert)이 존재하는 지 확인하였다(도 1). 확인 후 서열분석(sequencing)을 통해서 원하는 플라스미드가 생산되었는지 확인하였다(도 2, 3, 4, 5). 생성된 플라스미드는 하기 실시예에 주형으로 사용되며 표준품, 즉 기준물질로서 장기 보관될 수 있다.

<47> <실시예 2> 재조합 HPV L1 플라스미드 대량 배양 및 정량

<48> 암피실린을 포함한 LB 액체 배지 10mL에 실시예 1의 플라스미드를 포함한 세포를 접종하여 37℃ 진탕 배양기(shaking incubator)에서 배양하였다. 밤새 배양 후 알칼라인 라이시스(alkaline lysis) 방법을 이용하여 표적 플라스미드 DNA를 분리하였다. 분광광도계(spectrophotometer)를 이용하여 DNA의 양을 정확하게 정량하고 플라스미드의 카피 수를 다음과 같은 방법으로 계산하였다.

【수학식 1】

<49> A base pair(bp) 플라스미드 1개의 질량

$$\text{<50> } = (A \times 660 \text{ g/mole}) / (6.023 \times 10^{23} \text{ molecule/mole}) = A \times 10^{-21} \text{ g}$$

<51> 예) 1kb 단편의 1 카피 수의 질량=(1000bp X 660g/mole)/(6.023 X 10²³ molecules)
=1 X10⁻¹⁸ g

<52> 예에서 의미하는 것은 1kb 크기의 플라스미드 DNA 1 카피의 무게는 1 X 10⁻¹⁸ g(1 fg)이며, 1kb 플라스미드 DNA 1g에는 10¹⁸개 카피의 플라스미드가 존재한다는 것이다. 상기 식을 사용하여, 서로 다른 타입의 플라스미드의 카피수를 계산하고, 1000 카피에서부터 2배씩 차례로 희석하여서 사용하였다. 각각 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25 카피의 플라스미드를 포함하는 용액을 만들어 사용하였다.

<53> <실시예 3> 재조합 HPV L1 플라스미드를 이용한 특정 프라이머 민감도 실험

<54> 주형은 실시예 2에서 제조한 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25 카피/μl를 가지고 있는 DNA 용액 10 μl씩 사용하였다. 즉 10 μl내에는 각각 2000, 1000, 500, 250, 125, 62.5 카피의 DNA를 포함하고 있는 것이라 할 수 있다. 도 6에 따라서 유사성이 높은 곳으로부터 PCR 프라이머 서열번호 1 내지 8(표 2)을 선정하여 본 발명에 사용하였다.

【표 2】

| Genotype | sense primer | anti-sense primer |
|----------|------------------------------|------------------------------|
| HPV11 | TTAGGCGTGGGTGTTAGTGG(서열번호 1) | AAAATTCATAGCACCAAAGC(서열번호 2) |
| HPV16 | TTAGGTGTGGCATTAGTG(서열번호 3) | AAAGTCCATAGCACCAAAGC(서열번호 4) |
| HPV18 | TTAGGTGTGGCCTTAGTG(서열번호 5) | AAAGTCCATGGCACCATAT(서열번호 6) |
| HPV31 | TTAGGTGTAGGTATTAGTG(서열번호 7) | AAAATCCATAGCTCCAAAG(서열번호 8) |

<56> PCR을 하기 위해서 2.5 mM dNTP 5 μ l, 10X 버퍼 5 μ l, 서열번호 1 내지 8의 프라이머(20 pmol)와 탁 중합효소(Taq polymerase, Super Taq.) 0.5 μ l를 최종 부피(final volume)가 40 μ l가 되도록 맞춘 혼합물(mixture)을 만든 후에 이 혼합물에 각각의 주형 10 μ l씩 분주하여서 PCR 혼합물을 제조하였다. PCR 조건은 변성(94℃, 1 분), 결합(51℃, 1 분), 연장(72℃, 1분)을 35 사이클 반복한 후에 마지막으로 72℃에서 10분 동안 연장하였다. PCR이 끝난 후에 PCR 산물을 1.5% 아가로스 겔(agarose gel)에서 40분 동안 러닝(running)시킨 후에 에티디움 브로마이드(Ethidium bromide; EtBr)로 염색해서 밴드의 세기(intensity)를 확인하였다. 각각의 세기는 바이오-라드(bio-rad)의 Quantity One이라는 소프트웨어를 사용해서 같은 범위 내에 세기를 측정 한 후에, 세기와 카피수와의 상관관계를 알아보는 회귀함수를 구하고, 상관계수(relative coefficient; R)를 계산하여서 0.9 이상이 되는지 확인하였다. 본 발명인이 개량한 민감한 PCR 증폭법의 민감성을 알아보기 위해서 실험한 결과, 모든 타입에서 62.5 카피까지 검출하는 민감도를 나타낼 수 있었으며, DNA를 아가로스 겔에 러닝 시켜서 세기와 카피 수의 상관관계를 알아보았을 때에, 도 7에서 보는 바와 같이 상관계수가 0.9 이상으로 나오는 것으로 보아 우리의 방법을 통해 검정된 카피수는 믿을 만 한 것이라는 결론을 내릴 수 있다.

<57> <실시예 4> 재조합 HPV L1 플라스미드를 이용한 프라이머 특이성 실험

<58> 실시예 3에서 사용한 프라이머가 각각의 유전형에 특이하게 증폭을 하는지 알아보기 위하여, 각각 다른 유전형의 프라이머를 가지고 다른 유전형의 HPV L1 주

형을 차별적으로 증폭하는지의 여부를 알아보았다. 실시예 3에서 시행한 PCR 조건과 똑같이 하되, 주형의 농도는 각각 1000 카피로 고정하였다. 이 경우 각각 서로 다른 유형의 주형을 사용하되, 프라이머는 오직 한 유형의 프라이머를 사용하여 PCR을 수행하였다. 한 가지의 프라이머를 가지고 서로 다른 유전자형의 DNA 1000 카피를 주형을 사용해서 PCR을 수행한 결과, 11, 16, 18, 31 프라이머 모두 특이하게(specific) 자신의 주형만을 증폭(amplification)시켰다(도 8). 발명자가 최적화한 PCR증폭 조건하에서 자신의 유형(type)만을 확실히 검출하는 것으로 보아서, 서로 다른 프라이머를 가지고 임상시료내의 HPV 유전자 타입핑(typing)이 가능하며, 자궁경부암으로 발전할 가능성이 높은 고위험군에 속하는 HPV 11, 16, 18 유전형을 차별적으로 검출 가능하므로 임상 진단에 매우 중요한 수단(tool)이 될 수 있다.

<59> <실시예 5> 재조합 HPV L1 플라스미드를 이용한 프라이머 열가혹성 및 장기 보존 실험

<60> 열가혹성 실험 및 장기 보존 실험을 위해서 1000 카피의 플라스미드 각각을 30 μ l씩 DNase/RNase free 용기에 15개씩 분주하였다. 열가혹성 실험을 위해 4℃, 22℃, 37℃의 세 가지 온도에 각각을 보관하고, 장기 보존 실험을 위해 -80℃의 온도에서 각각 보관하였다. 보관 후 3주마다 각각의 온도에서 한 개의 바이알(vial)씩 꺼내어 실시예 3의 방법으로 민감도 실험을 수행하였다. 보관 3주 후 22℃와 37℃에서는 PCR 결과가 대부분 음성이었고 이는 22℃와 37℃에 보관된 표준품의 안전성이 매우 낮음을 의미한다(도 9). 그러나 4℃와 -80℃에 DNA 표준품을 보관한지

15주 후에 실험을 수행한 결과 여전히 민감도를 강하게 나타나는 것을 알 수 있었으며, 본 DNA 표준품은 -80°C 에서 장기 보존이 가능하다는 것을 보여준다(도 10).

<61> <실시예 6> 재조합 HPV L1 플라스미드를 이용한 프라이머 응용가능성

<62> 본 발명에서 개발한 HPV L1 주형 및 프라이머를 이용하여 인간 임상 시료 내에 존재하는 HPV 유전자를 어느 정도로 검출할 수 있는지 알아보기 위하여 실험을 실시하였다. Human rhabdomyosarcoma(횡문근육종, RD), HeLa, SKL 세포의 게놈 DNA(genomic DNA)를 키아젠 게놈 DNA 추출 키트(QIAGEN genomic DNA extraction kit)를 사용하여서 추출한 후 분광광도계를 통해서 게놈 DNA의 농도를 계산하였다. 각각의 DNA를 10ng, 100ng으로 희석하고, $100\mu\text{l}$ 씩 분주(aliquots)하여 -20°C 에 보관하였다. 게놈 DNA 배경(genomic DNA background)이 100ng, $1\mu\text{g}$ 이 되도록 하여서 실시예 3의 민감도 실험에서와 같은 주형을 사용하여서 PCR을 수행하였다. PCR product의 분석방법은 민감성 시험을 위한 방법과 동일하게 수행하였다. 도 11에서 보는 바와 같이 게놈 DNA의 배경에서 PCR을 수행한 결과 게놈 DNA가 없는 조건에서와 마찬가지로 62.5카피까지 감지 할 수 있었다. HeLa 세포에서는 HPV 18 유전자가 있기 때문에 모든 레인에서 양성 반응을 나타낸다.

【발명의 효과】

<63> 본 발명은 기존의 인유두종 바이러스 (Human Papilloma Virus) 핵산 증폭방법을 개량하여 정량화된 핵산 증폭방법을 수립한 핵산증폭 방법의 표준품으로서 고

위험군 11, 16, 18과 저위험군 31의 유전자를 구축하여 고가 장비 없이도 일반 실험실에서 PCR을 이용하여 62.5 카피의 HPV 유전자를 감지 할 수 있는 정량 검증 방법에 관한 것이다. 또한 이를 이용하여 HPV 진단 kit 개발이 가능하며, 양성대조군으로 쓰일 표준품으로서의 DNA를 제공하는 것이다. HPV 백신과 백신 사용 후 유효성 및 위해도 검증들을 위해 바이러스를 검출해 낼 수 있는 매우 정확하고 민감성이 뛰어난 진단 방법으로 사용할 수 있는 가능성이 있다.

【특허청구범위】**【청구항 1】**

서열번호 1과 2의 프라이머 쌍, 서열번호 3과 4의 프라이머 쌍, 서열번호 5와 6의 프라이머 쌍 및 서열번호 7과 8의 프라이머 쌍 중에서 선택된 프라이머 쌍.

【청구항 2】

서열번호 1과 2의 프라이머 쌍, 서열번호 3과 4의 프라이머 쌍, 서열번호 5와 6의 프라이머 쌍 및 서열번호 7과 8의 프라이머 쌍 중에서 선택된 하나 이상의 프라이머 쌍을 사용하여 생물학적 시료의 DNA에 대해 증합효소 연쇄반응을 수행하여 HPV의 DNA를 증폭하는 방법.

【청구항 3】

제 2항에 있어서, 서열번호 1과 2의 프라이머 쌍을 사용하여 HPV11-L1 DNA를 증폭하는 방법.

【청구항 4】

제 2항에 있어서, 서열번호 3과 4의 프라이머 쌍을 사용하여 HPV16-L1 DNA를 증폭하는 방법.

【청구항 5】

제 2항에 있어서, 서열번호 5와 6의 프라이머 쌍을 사용하여 HPV18-L1 DNA를 증폭하는 방법.

【청구항 6】

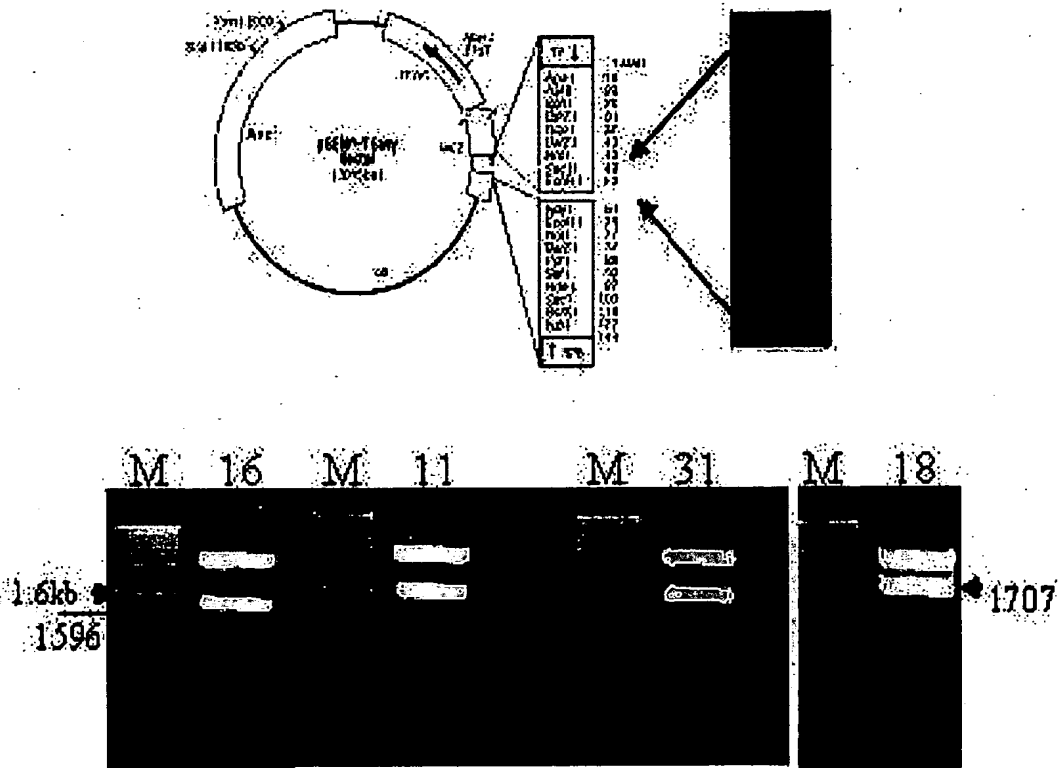
제 2항에 있어서, 서열번호 7과 8의 프라이머 쌍을 사용하여 HPV31-L1 DNA를 증폭하는 방법.

【청구항 7】

서열번호 1과 2의 프라이머 쌍, 서열번호 3과 4의 프라이머 쌍, 서열번호 5와 6의 프라이머 쌍 및 서열번호 7과 8의 프라이머 쌍 중 선택된 하나 이상의 프라이머 쌍을 포함하는 HPV의 DNA 검출용 키트.

【도면】

【도 1】



34-25

34-26

【 4 】

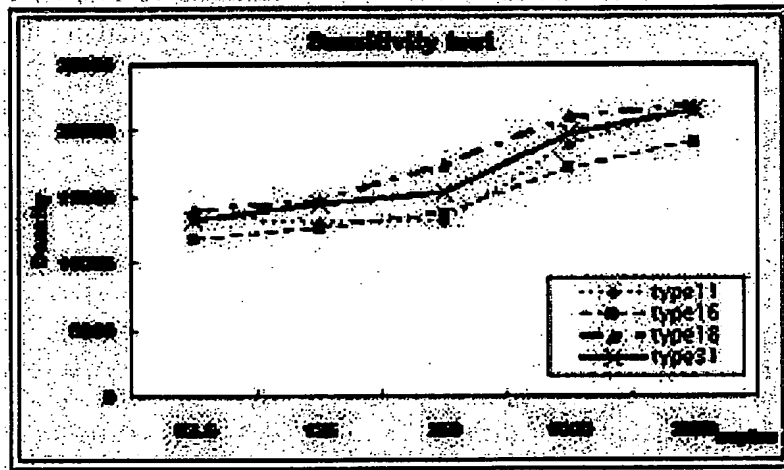
| | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 | 70 | 80 | 90 | 100 | 110 | 120 | 130 |
|-------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|----|----|----|----|----|----|----|----|-----|-----|-----|-----|
| NE 041025 DPVIL J.1 Continued | 117 120 125 130 135 140 145 150 155 160 165 170 175 180 | | | | | | | | | | | | |
| NE 041025 DPVIL J.1 Continued | 185 190 195 200 205 210 215 220 225 230 235 240 245 250 | | | | | | | | | | | | |
| NE 041025 DPVIL J.1 Continued | 255 260 265 270 275 280 285 290 295 300 305 310 315 320 | | | | | | | | | | | | |
| NE 041025 DPVIL J.1 Continued | 325 330 335 340 345 350 355 360 365 370 375 380 385 390 | | | | | | | | | | | | |
| NE 041025 DPVIL J.1 Continued | 395 400 405 410 415 420 425 430 435 440 445 450 455 460 | | | | | | | | | | | | |
| NE 041025 DPVIL J.1 Continued | 465 470 475 480 485 490 495 500 505 510 515 520 525 530 | | | | | | | | | | | | |
| NE 041025 DPVIL J.1 Continued | 535 540 545 550 555 560 565 570 575 580 585 590 595 600 | | | | | | | | | | | | |
| NE 041025 DPVIL J.1 Continued | 605 610 615 620 625 630 635 640 645 650 655 660 665 670 | | | | | | | | | | | | |
| NE 041025 DPVIL J.1 Continued | 675 680 685 690 695 700 705 710 715 720 725 730 735 740 | | | | | | | | | | | | |
| NE 041025 DPVIL J.1 Continued | 745 750 755 760 765 770 775 780 785 790 795 800 805 810 | | | | | | | | | | | | |
| NE 041025 DPVIL J.1 Continued | 815 820 825 830 835 840 845 850 855 860 865 870 875 880 | | | | | | | | | | | | |
| NE 041025 DPVIL J.1 Continued | 885 890 895 900 905 910 915 920 925 930 935 940 945 950 | | | | | | | | | | | | |
| NE 041025 DPVIL J.1 Continued | 955 960 965 970 975 980 985 990 995 1000 1005 1010 1015 1020 | | | | | | | | | | | | |
| NE 041025 DPVIL J.1 Continued | 1025 1030 1035 1040 1045 1050 1055 1060 1065 1070 1075 1080 1085 1090 | | | | | | | | | | | | |
| NE 041025 DPVIL J.1 Continued | 1095 1100 1105 1110 1115 1120 1125 1130 1135 1140 1145 1150 1155 1160 | | | | | | | | | | | | |
| NE 041025 DPVIL J.1 Continued | 1165 1170 1175 1180 1185 1190 1195 1200 1205 1210 1215 1220 1225 1230 | | | | | | | | | | | | |
| NE 041025 DPVIL J.1 Continued | 1235 1240 1245 1250 1255 1260 1265 1270 1275 1280 1285 1290 1295 1300 | | | | | | | | | | | | |
| NE 041025 DPVIL J.1 Continued | 1305 1310 1315 1320 1325 1330 1335 1340 1345 1350 1355 1360 1365 1370 | | | | | | | | | | | | |
| NE 041025 DPVIL J.1 Continued | 1375 1380 1385 1390 1395 1400 1405 1410 1415 1420 1425 1430 1435 1440 | | | | | | | | | | | | |
| NE 041025 DPVIL J.1 Continued | 1445 1450 1455 1460 1465 1470 1475 1480 1485 1490 1495 1500 1505 1510 | | | | | | | | | | | | |
| NE 041025 DPVIL J.1 Continued | 1515 1520 1525 1530 1535 1540 1545 1550 1555 1560 1565 1570 1575 1580 | | | | | | | | | | | | |
| NE 041025 DPVIL J.1 Continued | 1585 1590 1595 1600 1605 1610 1615 1620 1625 1630 1635 1640 1645 1650 | | | | | | | | | | | | |
| NE 041025 DPVIL J.1 Continued | 1655 1660 1665 1670 1675 1680 1685 1690 1695 1700 1705 1710 1715 1720 | | | | | | | | | | | | |
| NE 041025 DPVIL J.1 Continued | 1725 1730 1735 1740 1745 1750 1755 1760 1765 1770 1775 1780 1785 1790 | | | | | | | | | | | | |
| NE 041025 DPVIL J.1 Continued | 1795 1800 1805 1810 1815 1820 1825 1830 1835 1840 1845 1850 1855 1860 | | | | | | | | | | | | |
| NE 041025 DPVIL J.1 Continued | 1865 1870 1875 1880 1885 1890 1895 1900 1905 1910 1915 1920 1925 1930 | | | | | | | | | | | | |
| NE 041025 DPVIL J.1 Continued | 1935 1940 1945 1950 1955 1960 1965 1970 1975 1980 1985 1990 1995 2000 | | | | | | | | | | | | |

【 5 】

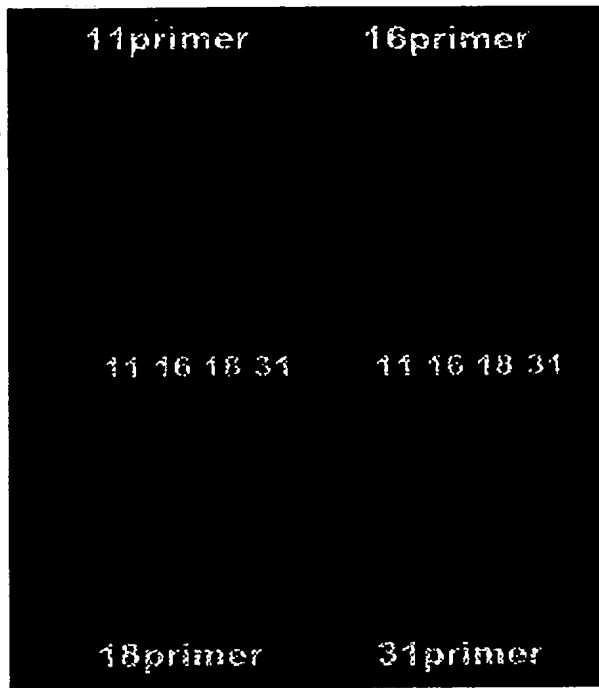
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 | 70 | 80 | 90 | 100 | 110 | 120 | 130 | 140 | 150 | 160 | 170 | 180 | 190 | 200 | 210 | 220 | 230 | 240 | 250 | 260 | 270 | 280 | 290 | 300 | 310 | 320 | 330 | 340 | 350 | 360 | 370 | 380 | 390 | 400 | 410 | 420 | 430 | 440 | 450 | 460 | 470 | 480 | 490 | 500 | 510 | 520 | 530 | 540 | 550 | 560 | 570 | 580 | 590 | 600 | 610 | 620 | 630 | 640 | 650 | 660 | 670 | 680 | 690 | 700 | 710 | 720 | 730 | 740 | 750 | 760 | 770 | 780 | 790 | 800 | 810 | 820 | 830 | 840 | 850 | 860 | 870 | 880 | 890 | 900 | 910 | 920 | 930 | 940 | 950 | 960 | 970 | 980 | 990 | 1000 | 1010 | 1020 | 1030 | 1040 | 1050 | 1060 | 1070 | 1080 | 1090 | 1100 | 1110 | 1120 | 1130 | 1140 | 1150 | 1160 | 1170 | 1180 | 1190 | 1200 | 1210 | 1220 | 1230 | 1240 | 1250 | 1260 | 1270 | 1280 | 1290 | 1300 | 1310 | 1320 | 1330 | 1340 | 1350 | 1360 | 1370 | 1380 | 1390 | 1400 | 1410 | 1420 | 1430 | 1440 | 1450 | 1460 | 1470 | 1480 | 1490 | 1500 | 1510 | 1520 | 1530 | 1540 | 1550 | 1560 | 1570 | 1580 | 1590 | 1600 | 1610 | 1620 | 1630 | 1640 | 1650 | 1660 | 1670 | 1680 | 1690 | 1700 | 1710 | 1720 | 1730 | 1740 | 1750 | 1760 | 1770 | 1780 | 1790 | 1800 | 1810 | 1820 | 1830 | 1840 | 1850 | 1860 | 1870 | 1880 | 1890 | 1900 | 1910 | 1920 | 1930 | 1940 | 1950 | 1960 | 1970 | 1980 | 1990 | 2000 | 2010 | 2020 | 2030 | 2040 | 2050 | 2060 | 2070 | 2080 | 2090 | 2100 | 2110 | 2120 | 2130 | 2140 | 2150 | 2160 | 2170 | 2180 | 2190 | 2200 | 2210 | 2220 | 2230 | 2240 | 2250 | 2260 | 2270 | 2280 | 2290 | 2300 | 2310 | 2320 | 2330 | 2340 | 2350 | 2360 | 2370 | 2380 | 2390 | 2400 | 2410 | 2420 | 2430 | 2440 | 2450 | 2460 | 2470 | 2480 | 2490 | 2500 | 2510 | 2520 | 2530 | 2540 | 2550 | 2560 | 2570 | 2580 | 2590 | 2600 | 2610 | 2620 | 2630 | 2640 | 2650 | 2660 | 2670 | 2680 | 2690 | 2700 | 2710 | 2720 | 2730 | 2740 | 2750 | 2760 | 2770 | 2780 | 2790 | 2800 | 2810 | 2820 | 2830 | 2840 | 2850 | 2860 | 2870 | 2880 | 2890 | 2900 | 2910 | 2920 | 2930 | 2940 | 2950 | 2960 | 2970 | 2980 | 2990 | 3000 | 3010 | 3020 | 3030 | 3040 | 3050 | 3060 | 3070 | 3080 | 3090 | 3100 | 3110 | 3120 | 3130 | 3140 | 3150 | 3160 | 3170 | 3180 | 3190 | 3200 | 3210 | 3220 | 3230 | 3240 | 3250 | 3260 | 3270 | 3280 | 3290 | 3300 | 3310 | 3320 | 3330 | 3340 | 3350 | 3360 | 3370 | 3380 | 3390 | 3400 | 3410 | 3420 | 3430 | 3440 | 3450 | 3460 | 3470 | 3480 | 3490 | 3500 | 3510 | 3520 | 3530 | 3540 | 3550 | 3560 | 3570 | 3580 | 3590 | 3600 | 3610 | 3620 | 3630 | 3640 | 3650 | 3660 | 3670 | 3680 | 3690 | 3700 | 3710 | 3720 | 3730 | 3740 | 3750 | 3760 | 3770 | 3780 | 3790 | 3800 | 3810 | 3820 | 3830 | 3840 | 3850 | 3860 | 3870 | 3880 | 3890 | 3900 | 3910 | 3920 | 3930 | 3940 | 3950 | 3960 | 3970 | 3980 | 3990 | 4000 | 4010 | 4020 | 4030 | 4040 | 4050 | 4060 | 4070 | 4080 | 4090 | 4100 | 4110 | 4120 | 4130 | 4140 | 4150 | 4160 | 4170 | 4180 | 4190 | 4200 | 4210 | 4220 | 4230 | 4240 | 4250 | 4260 | 4270 | 4280 | 4290 | 4300 | 4310 | 4320 | 4330 | 4340 | 4350 | 4360 | 4370 | 4380 | 4390 | 4400 | 4410 | 4420 | 4430 | 4440 | 4450 | 4460 | 4470 | 4480 | 4490 | 4500 | 4510 | 4520 | 4530 | 4540 | 4550 | 4560 | 4570 | 4580 | 4590 | 4600 | 4610 | 4620 | 4630 | 4640 | 4650 | 4660 | 4670 | 4680 | 4690 | 4700 | 4710 | 4720 | 4730 | 4740 | 4750 | 4760 | 4770 | 4780 | 4790 | 4800 | 4810 | 4820 | 4830 | 4840 | 4850 | 4860 | 4870 | 4880 | 4890 | 4900 | 4910 | 4920 | 4930 | 4940 | 4950 | 4960 | 4970 | 4980 | 4990 | 5000 | 5010 | 5020 | 5030 | 5040 | 5050 | 5060 | 5070 | 5080 | 5090 | 5100 | 5110 | 5120 | 5130 | 5140 | 5150 | 5160 | 5170 | 5180 | 5190 | 5200 | 5210 | 5220 | 5230 | 5240 | 5250 | 5260 | 5270 | 5280 | 5290 | 5300 | 5310 | 5320 | 5330 | 5340 | 5350 | 5360 | 5370 | 5380 | 5390 | 5400 | 5410 | 5420 | 5430 | 5440 | 5450 | 5460 | 5470 | 5480 | 5490 | 5500 | 5510 | 5520 | 5530 | 5540 | 5550 | 5560 | 5570 | 5580 | 5590 | 5600 | 5610 | 5620 | 5630 | 5640 | 5650 | 5660 | 5670 | 5680 | 5690 | 5700 | 5710 | 5720 | 5730 | 5740 | 5750 | 5760 | 5770 | 5780 | 5790 | 5800 | 5810 | 5820 | 5830 | 5840 | 5850 | 5860 | 5870 | 5880 | 5890 | 5900 | 5910 | 5920 | 5930 | 5940 | 5950 | 5960 | 5970 | 5980 | 5990 | 6000 | 6010 | 6020 | 6030 | 6040 | 6050 | 6060 | 6070 | 6080 | 6090 | 6100 | 6110 | 6120 | 6130 | 6140 | 6150 | 6160 | 6170 | 6180 | 6190 | 6200 | 6210 | 6220 | 6230 | 6240 | 6250 | 6260 | 6270 | 6280 | 6290 | 6300 | 6310 | 6320 | 6330 | 6340 | 6350 | 6360 | 6370 | 6380 | 6390 | 6400 | 6410 | 6420 | 6430 | 6440 | 6450 | 6460 | 6470 | 6480 | 6490 | 6500 | 6510 | 6520 | 6530 | 6540 | 6550 | 6560 | 6570 | 6580 | 6590 | 6600 | 6610 | 6620 | 6630 | 6640 | 6650 | 6660 | 6670 | 6680 | 6690 | 6700 | 6710 | 6720 | 6730 | 6740 | 6750 | 6760 | 6770 | 6780 | 6790 | 6800 | 6810 | 6820 | 6830 | 6840 | 6850 | 6860 | 6870 | 6880 | 6890 | 6900 | 6910 | 6920 | 6930 | 6940 | 6950 | 6960 | 6970 | 6980 | 6990 | 7000 | 7010 | 7020 | 7030 | 7040 | 7050 | 7060 | 7070 | 7080 | 7090 | 7100 | 7110 | 7120 | 7130 | 7140 | 7150 | 7160 | 7170 | 7180 | 7190 | 7200 | 7210 | 7220 | 7230 | 7240 | 7250 | 7260 | 7270 | 7280 | 7290 | 7300 | 7310 | 7320 | 7330 | 7340 | 7350 | 7360 | 7370 | 7380 | 7390 | 7400 | 7410 | 7420 | 7430 | 7440 | 7450 | 7460 | 7470 | 7480 | 7490 | 7500 | 7510 | 7520 | 7530 | 7540 | 7550 | 7560 | 7570 | 7580 | 7590 | 7600 | 7610 | 7620 | 7630 | 7640 | 7650 | 7660 | 7670 | 7680 | 7690 | 7700 | 7710 | 7720 | 7730 | 7740 | 7750 | 7760 | 7770 | 7780 | 7790 | 7800 | 7810 | 7820 | 7830 | 7840 | 7850 | 7860 | 7870 | 7880 | 7890 | 7900 | 7910 | 7920 | 7930 | 7940 | 7950 | 7960 | 7970 | 7980 | 7990 | 8000 | 8010 | 8020 | 8030 | 8040 | 8050 | 8060 | 8070 | 8080 | 8090 | 8100 | 8110 | 8120 | 8130 | 8140 | 8150 | 8160 | 8170 | 8180 | 8190 | 8200 | 8210 | 8220 | 8230 | 8240 | 8250 | 8260 | 8270 | 8280 | 8290 | 8300 | 8310 | 8320 | 8330 | 8340 | 8350 | 8360 | 8370 | 8380 | 8390 | 8400 | 8410 | 8420 | 8430 | 8440 | 8450 | 8460 | 8470 | 8480 | 8490 | 8500 | 8510 | 8520 | 8530 | 8540 | 8550 | 8560 | 8570 | 8580 | 8590 | 8600 | 8610 | 8620 | 8630 | 8640 | 8650 | 8660 | 8670 | 8680 | 8690 | 8700 | 8710 | 8720 | 8730 | 8740 | 8750 | 8760 | 8770 | 8780 | 8790 | 8800 | 8810 | 8820 | 8830 | 8840 | 8850 | 8860 | 8870 | 8880 | 8890 | 8900 | 8910 | 8920 | 8930 | 8940 | 8950 | 8960 | 8970 | 8980 | 8990 | 9000 | 9010 | 9020 | 9030 | 9040 | 9050 | 9060 | 9070 | 9080 | 9090 | 9100 | 9110 | 9120 | 9130 | 9140 | 9150 | 9160 | 9170 | 9180 | 9190 | 9200 | 9210 | 9220 | 9230 | 9240 | 9250 | 9260 | 9270 | 9280 | 9290 | 9300 | 9310 | 9320 | 9330 | 9340 | 9350 | 9360 | 9370 | 9380 | 9390 | 9400 | 9410 | 9420 | 9430 | 9440 | 9450 | 9460 | 9470 | 9480 | 9490 | 9500 | 9510 | 9520 | 9530 | 9540 | 9550 | 9560 | 9570 | 9580 | 9590 | 9600 | 9610 | 9620 | 9630 | 9640 | 9650 | 9660 | 9670 | 9680 | 9690 | 9700 | 9710 | 9720 | 9730 | 9740 | 9750 | 9760 | 9770 | 9780 | 9790 | 9800 | 9810 | 9820 | 9830 | 9840 | 9850 | 9860 | 9870 | 9880 | 9890 | 9900 | 9910 | 9920 | 9930 | 9940 | 9950 | 9960 | 9970 | 9980 | 9990 | 10000 | 10010 | 10020 | 10030 | 10040 | 10050 | 10060 | 10070 | 10080 | 10090 | 10100 | 10110 | 10120 | 10130 | 10140 | 10150 | 10160 | 10170 | 10180 | 10190 | 10200 | 10210 | 10220 | 10230 | 10240 | 10250 | 10260 | 10270 | 10280 | 10290 | 10300 | 10310 | 10320 | 10330 | 10340 | 10350 | 10360 | 10370 | 10380 | 10390 | 10400 | 10410 | 10420 | 10430 | 10440 | 10450 | 10460 | 10470 | 10480 | 10490 | 10500 | 10510 | 10520 | 10530 | 10540 | 10550 | 10560 | 10570 | 10580 | 10590 | 10600 | 10610 | 10620 | 10630 | 10640 | 10650 | 10660 | 10670 | 10680 | 10690 | 10700 | 10710 | 10720 | 10730 | 10740 | 10750 | 10760 | 10770 | 10780 | 10790 | 10800 | 10810 | 10820 | 10830 | 10840 | 10850 | 10860 | 10870 | 10880 | 10890 | 10900 | 10910 | 10920 | 10930 | 10940 | 10950 | 10960 | 10970 | 10980 | 10990 | 11000 | 11010 | 11020 | 11030 | 11040 | 11050 | 11060 | 11070 | 11080 | 11090 | 11100 | 11110 | 11120 | 11130 | 11140 | 11150 | 11160 | 11170 | 11180 | 11190 | 11200 | 11210 | 11220 | 11230 | 11240 | 11250 | 11260 | 11270 | 11280 | 11290 | 11300 | 11310 | 11320 | 11330 | 11340 | 11350 | 11360 | 11370 | 11380 | 11390 | 11400 | 11410 | 11420 | 11430 | 11440 | 11450 | 11460 | 11470 | 11480 | 11490 | 11500 | 11510 | 11520 | 11530 | 11540 | 11550 | 11560 | 11570 | 11580 | 11590 | 11600 | 11610 | 11620 | 11630 | 11640 | 11650 | 11660 | 11670 | 11680 | 11690 | 11700 | 11710 | 11720 | 11730 | 11740 | 11750 | 11760 | 11770 | 11780 | 11790 | 11800 | 11810 | 11820 | 11830 | 11840 | 11850 | 11860 | 11870 | 11880 | 11890 | 11900 | 11910 | 11920 | 11930 | 11940 | 11950 | 11960 | 11970 | 11980 | 11990 | 12000 | 12010 | 12020 | 12030 | 12040 | 12050 | 12060 | 12070 | 12080 | 12090 | 12100 | 12110 | 12120 | 12130 | 12140 | 12150 | 12160 | 12170 | 12180 | 12190 | 12200 | 12210 | 12220 | 12230 | 12240 | 12250 | 12260 | 12270 | 12280 | 12290 | 12300 | 12310 | 12320 | 12330 | 12340 | 12350 | 12360 | 12370 | 12380 | 12390 | 12400 | 12410 | 12420 | 12430 | 12440 | 12450 | 12460 | 12470 | 12480 | 12490 | 12500 | 12510 | 12520 | 12530 | 12540 | 12550 | 12560 | 12570 | 12580 | 12590 | 12600 | 12610 | 12620 | 12630 | 12640 | 12650 | 12660 | 12670 | 12680 | 12690 | 12700 | 12710 | 12720 | 12730 | 12740 | 12750 | 12760 | 12770 | 12780 | 12790 | 12800 | 12810 | 12820 | 12830 | 12840 | 12850 | 12860 | 12870 | 12880 | 12890 | 12900 | 12910 | 12920 | 12930 | 12940 | 12950 | 12960 | 12970 | 12980 | 12990 | 13000 | 13010 | 13020 | 13030 | 13040 | 13050 | 13060 | 13070 | 13080 | 13090 | 13100 | 13110 | 13120 | 13130 | 13140 | 13150 | 13160 | 13170 | 13180 | 13190 | 13200 | 13210 | 13220 | 13230 | 13240 | 13250 | 13260 | 13270 | 13280 | 13290 | 13300 | 13310 | 13320 | 13330 | 13340 | 13350 | 13360 | 13370 | 13380 |
|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|



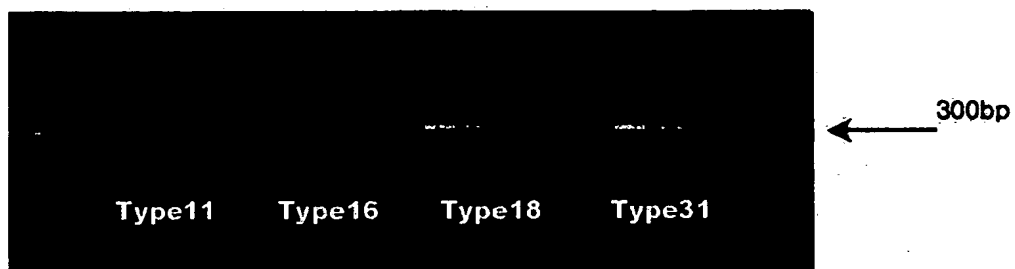
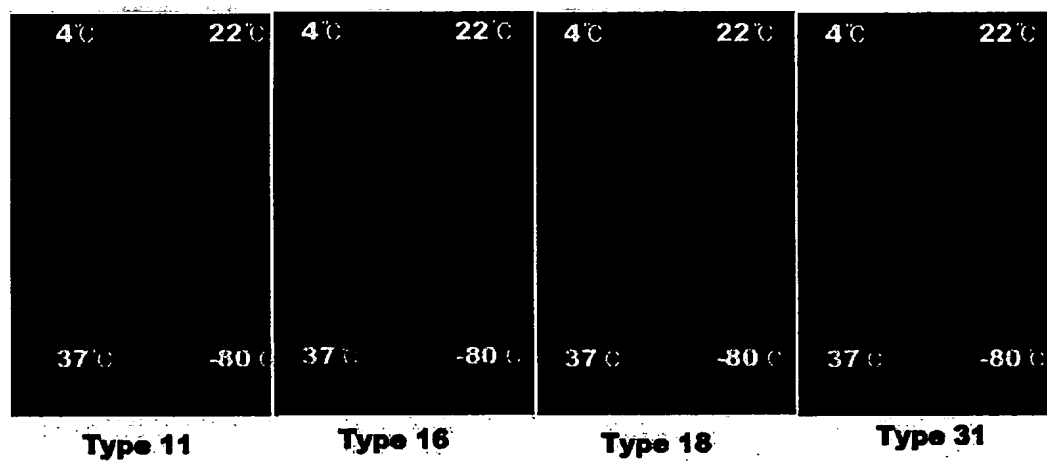
【도 7】



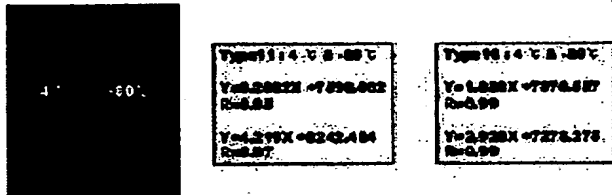
【도 8】



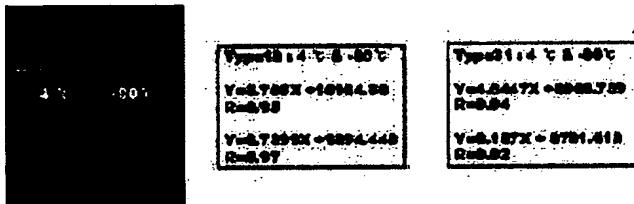
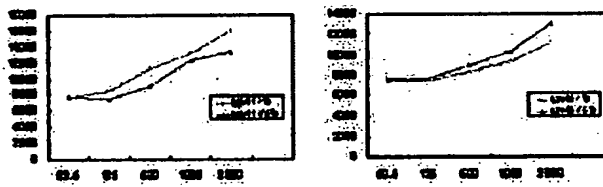
【図 9】

a. Time point : 0 week**b. Time point : 3 week**

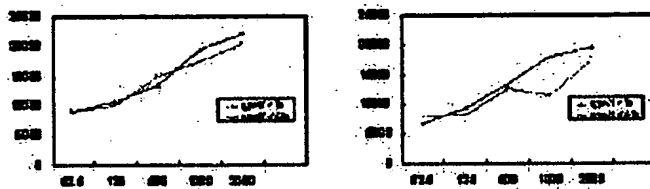
【図 10】



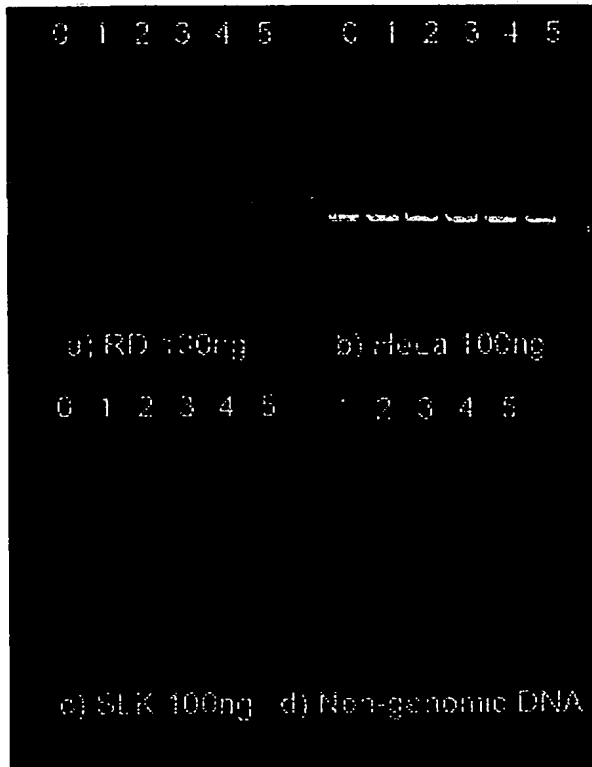
Type11 & Type16



Type16 & Type21



【도 11】



【서열목록】

서열목록 전자파일 첨부

-

<110> Sungkyunkwan university

<120> Method for diagnosing human papilloma virus

<160> 16

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> sense primer for amplifying the HPV11-L1 plasmid

<400> 1

ttaggcgttg gtgtagtg

20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> anti-sense primer for amplifying the HPV11-L1 plasmid

<400> 2

aaaattcata gcaccaaagc

20

<210> 3

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> sense primer for amplifying the HPV16-L1 plasmid

<400> 3

ttaggtgttg gcatttagtg

19

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> anti-sense primer for amplifying the HPV16-L1 plasmid

<400> 4

aaagtccata gcaccaaagc

20

<210> 5

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> sense primer for amplifying the HPV18-L1 plasmid

<400> 5

ttaggtgttg gccttagtg

19

<210> 6

<211> 19

```

<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> anti-sense primer for amplifying the HPV18-L1 plasmid

<400> 6
aaagtccatg gcacatat 19

<210> 7
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> sense primer for amplifying the HPV31-L1 plasmid

<400> 7
ttaggtgtag gtattagt 19

<210> 8
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> anti-sense primer for amplifying the HPV31-L1 plasmid

<400> 8
aaaatccata gtcctaaag 19

<210> 9
<211> 46
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> sense primer for amplifying the HPV16-L1

<400> 9
gcccccaagc ttgccgccac catgcaggcg acttttatit acatcc 46

<210> 10
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> anti-sense primer for amplifying the HPV16-L1

<400> 10
atcgggctcg agcagcttac gttttitgcg ttttagc 36

<210> 11
<211> 39
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> sense primer for amplifying the HPV18-L1

<400> 11
gcccccaagc ttgccgccac catgtgcctg tatacacgg 39

```

<210> 12
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> anti-sense primer for amplifying the HPV18-L1

<400> 12
 atcggggaat tccttcctgg cacgtacacg cacacg 36

<210> 13
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> sense primer for amplifying the HPV31-L1

<400> 13
 gcccccaagc ttgccgccac catgtctctg tggcggccta gc 42

<210> 14
 <211> 47
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> anti-sense primer for amplifying the HPV31-L1

<400> 14
 atcggggaat tccttttttag tttttttacg ttttgcctgg gtagtgg 47

<210> 15
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> sense primer for amplifying the HPV11-L1

<400> 15
 gcccccaagc ttgccgccac catgtggcgg cctagcgaca gc 42

<210> 16
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> anti-sense primer for amplifying the HPV11-L1

<400> 16
 atcggggaat tccttttttg ttttggtacg ttttcgtttg gg 42